

百日咳レファレンスセンター

- 1.活動報告と計画
- 2.百日咳菌の抗原検査
- 3.マクロライド耐性菌の検出状況

国立感染症研究所 細菌第二部 第一室

小出健太郎、後藤雅貴、大塚菜緒、蒲地一成

TEL: 042-848-7101（直通）

1. 活動報告と計画

百日咳レファレンスセンター



令和3年度の活動報告

- レファレンス関係の分与実績

| レファレンス | 地方衛生研究所 | |
|-------------------------------------|------------|-----|
| | レファレンスセンター | その他 |
| <i>Bordetella holmesii</i> -LAMPキット | 0 | 0 |
| 4PlexリアルタイムPCRキット | 0 | 0 |
| マクロライド耐性菌遺伝子検出キット | 0 | 0 |
| 計 | 0 | 0 |

- 百日咳に関する情報還元

1. 病原微生物検出情報 (IASR) 百日咳特集号 IASR Vol. 42. No.6, 2021年

2. 論文発表

- Wakimoto et al. The First Reported Case of *Bordetella pertussis* Bacteremia in a Patient With Human Immunodeficiency Virus Infection. Open Forum Infect Dis. 2022 Feb 7;9(3):ofac020.

令和4年度の活動計画

1) 百日咳検査体制の強化・拡充（継続）

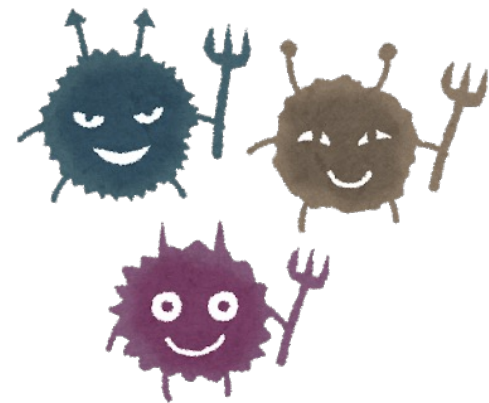
- 地方衛生研究所にレファレンスと検査キットの配布

今年度からマクロライド耐性菌遺伝子検出キットをレファレンスセンター以外の地研にも配布します。



2) 百日咳病原体サーベイランス

- 百日咳流行株の分子疫学
- マクロライド耐性百日咳菌



2. 百日咳の抗原検査

リボテスト百日咳

2021年に抗原検査キット（イムノクロマト法）が新規承認され、新たに届出基準に追加された



(4) 届出のために必要な検査所見

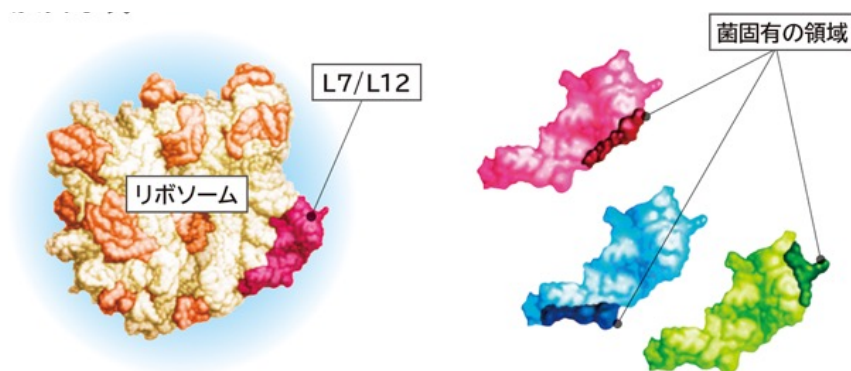
| 検査方法 | 検査材料 |
|---|----------------------|
| 分離・同定による病原体の検出 | 鼻腔、咽頭、気管支などから採取された検体 |
| 核酸増幅法による病原体の遺伝子の検出 (PCR法・LAMP法・その他) | |
| イムノクロマト法による病原体の抗原の検出 | 鼻咽頭拭い液 |
| 抗体の検出 (ペア血清による抗体陽転又は抗体価の有意な上昇、又は単一血清で抗体価の高値) | 血清 |

*Bordetella hinzii*への交差反応が報告されたため、百日咳類縁菌6菌種に対する交差反応性を評価した（感染症疫学センター，厚労省）

リボテスト百日咳のBordetella属細菌に対する交差反応性

| Bordetella species | Strain | Origin | CFU/10 μ L/assay | | | |
|----------------------------------|-----------|--------------------------|----------------------|--------|--------|--------|
| | | | 10^6 | 10^5 | 10^4 | 10^3 |
| <i>Bordetella pertussis</i> | Tohama | Human (vaccine strain) | + | + | - | - |
| | BP617 | Human (clinical isolate) | + | + | - | - |
| <i>Bordetella parapertussis</i> | ATCC15311 | Human (type strain) | + | + | - | - |
| <i>Bordetella holmesii</i> | ATCC51541 | Human (type strain) | + | + | - | - |
| <i>Bordetella bronchiseptica</i> | BB1 | Human (clinical isolate) | + | + | - | - |
| <i>Bordetella trematum</i> | BT1 | Human (clinical isolate) | + | + | +* | - |
| <i>Bordetella hinzii</i> | ATCC51730 | Chicken (type strain) | + | + | - | - |
| <i>Bordetella avium</i> | ATCC35086 | Turkey (type strain) | + | + | - | - |

* Positive for two independent tests



百日咳菌と同じ感度で百日咳類縁菌を検出した

百日咳菌東浜株の培養日数とリボテスト百日咳の検出感度

| 培養日数 | 生菌率 (%) | CFU/10 μ L/assay | | | | | |
|------|-----------|----------------------|--------|--------|--------|--------|------|
| | | 10^6 | 10^5 | 10^4 | 10^3 | 10^2 | <0.1 |
| 1 d | 10.2-12.6 | + | + | - | - | | |
| 3 d | 1.6-5.6 | | + | + | - | - | |
| 6 d | <0.01 | | | | | | + |

- 供試菌の培養日数により検出感度が大きく変動した生菌の最小検出感度： $10^5 \sim <0.1$ CFU/assay
- 生菌と同等な感度で死菌を検出した菌数の最小検出感度： 10^6 cells/assay



百日咳抗原検査は死菌体も検出できる可能性が指摘された

まとめ

- リボテスト百日咳は百日咳菌と同じ感度で百日咳類縁菌を検出する
- 本法による検査診断では百日咳菌と百日咳類縁菌の感染を鑑別できない

図3. 年齢・予防接種歴別百日咳症例届出数* 2018年第1週～2020年第53週 (n=29,833)
(感染症発生動向調査：2021年1月8日現在届出数)

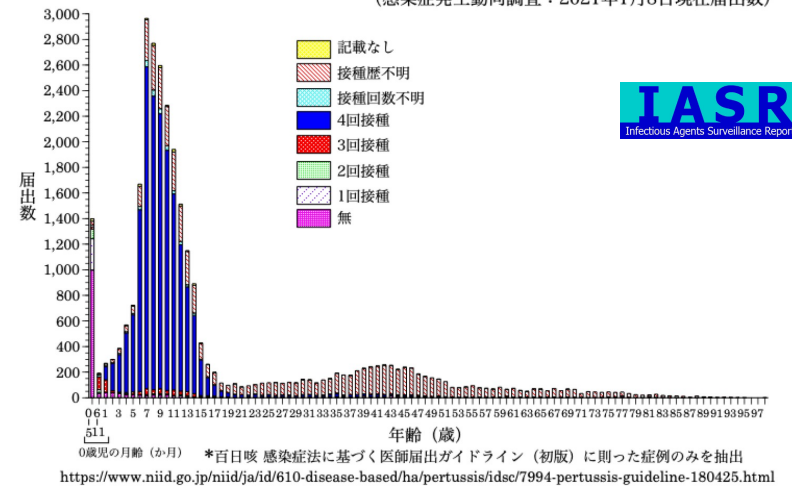
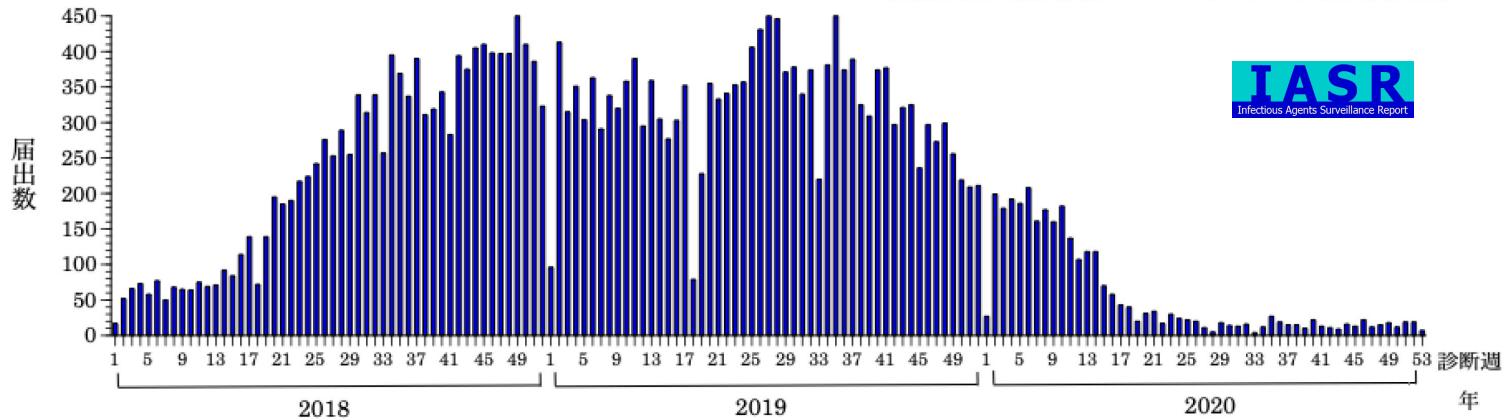


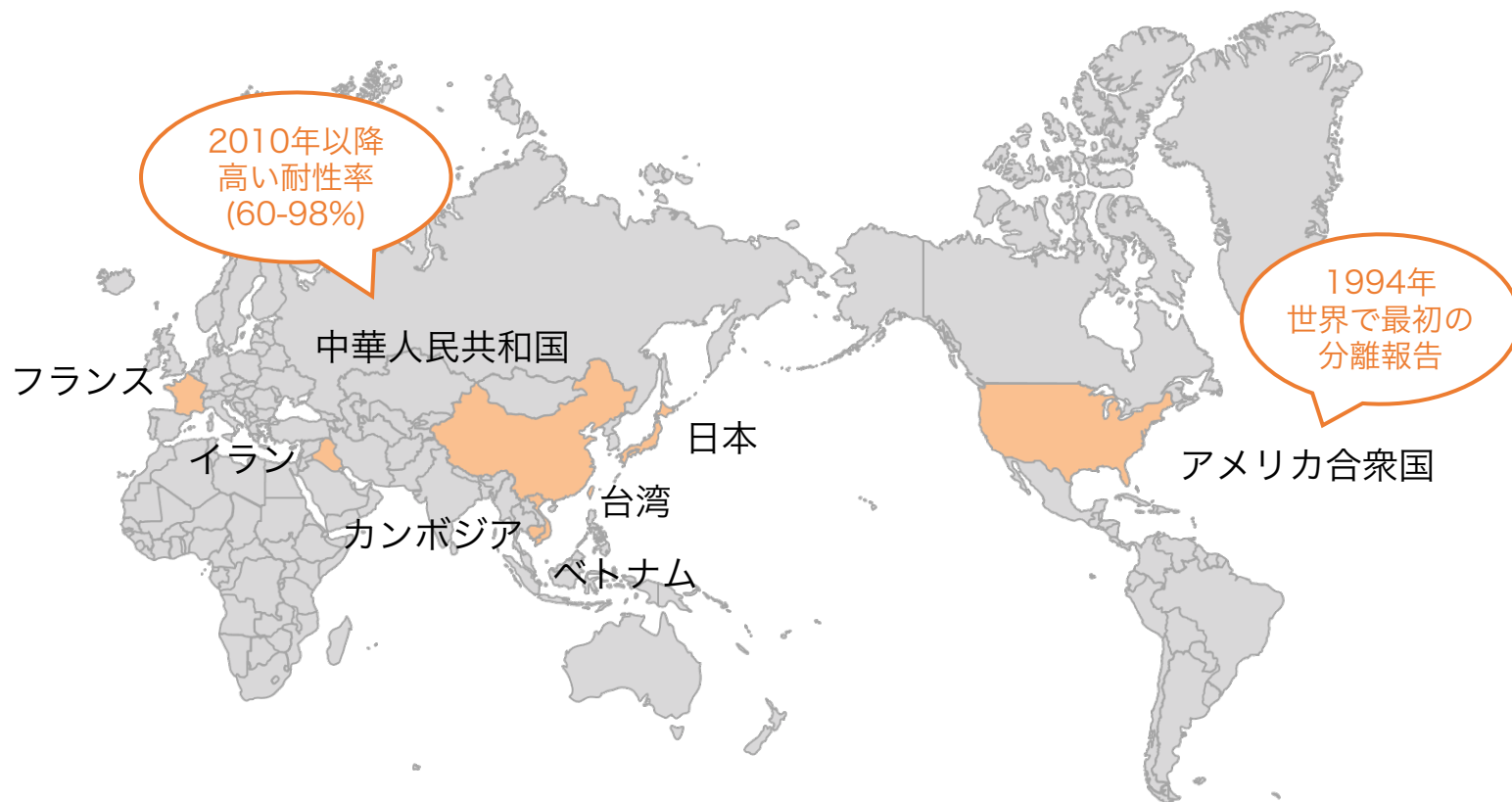
図1. 診断週別百日咳患者届出数, 2018年第1週～2020年第53週 (n=31,909)
(感染症発生動向調査：2021年4月13日現在届出数)



3. マクロライド耐性菌の検出状況

マクロライド耐性百日咳菌 (MRBP) とは？

- 百日咳の治療薬であるマクロライド系抗菌薬（エリスロマイシンやアジスロマイシンなど）に対して耐性を示す百日咳菌
- 治療薬が効かないことで重症化や治療期間の延長等につながるため、耐性菌の出現は公衆衛生上重要な問題のひとつ



マクロライド耐性百日咳菌の出現が報告されている国や地域

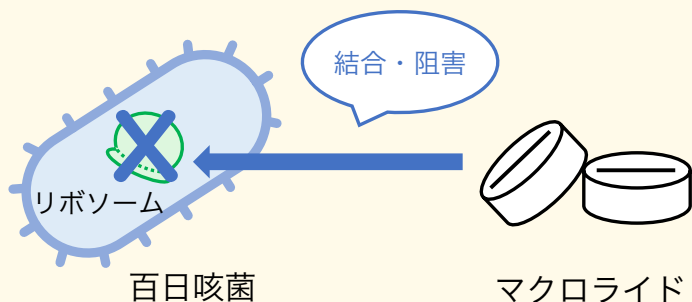
マクロライド耐性百日咳菌 (MRBP) の特徴

① A2047G変異

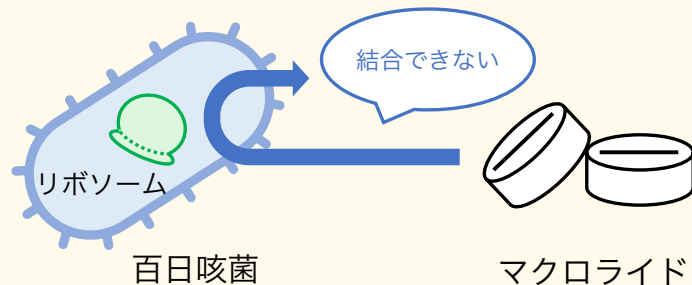
リボソームを構成する23S rRNA配列の2047番目の塩基がアデニン(A)からグアニン(G)に置換することで耐性化

* 検出キットの標的

マクロライド感受性百日咳菌 (MSBP)

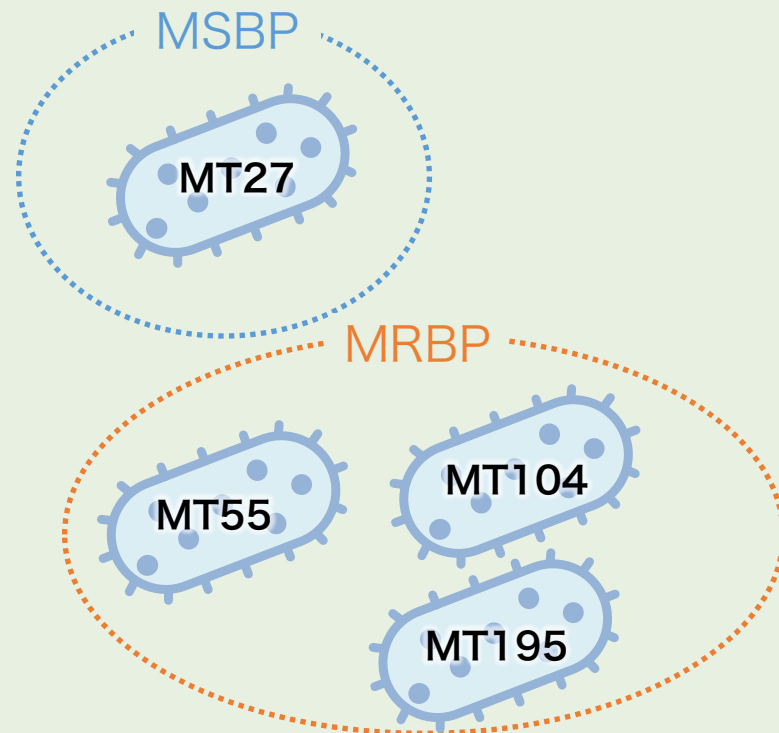


マクロライド耐性百日咳菌 (MRBP)



② 3つのMLVAタイプ

MLVA法(菌株が同じか違うかを遺伝子レベルで調べる分子疫学解析手法)によって、3つのMLVAタイプがMRBPから高頻度で見つかっている



感受性菌、耐性菌で多いMLVAタイプ

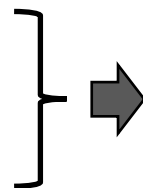
日本国内で分離されたマクロライド耐性百日咳菌



表. 日本で分離されたMRBP株の比較

| | BP616 | BP625 |
|-----------------------|--|--|
| 分離地域 | 大阪府 | 東京都 |
| 分離時期 | 2018年7月 | 2018年6月下旬 |
| 患者 | 男児 2ヶ月齢 | 男児 1カ月齢 |
| エリスロマイシンの 最小発育阻止濃度 | > 256 $\mu\text{g/mL}$ | > 256 $\mu\text{g/mL}$ |
| MLVAタイプ | MT195 | MT195 |
| 遺伝子型 | <i>ptxP1/ptxA1/prn1/ fim3A/fhaB3</i> | <i>ptxP1/ptxA1/prn1/ fim3A/fhaB3</i> |

- 2018年まで日本国内でMRBPの分離報告なし
- 2株は同時期に分離された
- 2株のMLVAタイプ、遺伝子型が一致



同一感染源？

マクロライド耐性百日咳菌の全ゲノム解析 その1

分子系統解析

- BP616、BP625含む日本および中国の臨床分離株のゲノム情報を解析
- 遺伝子上の一塩基変異を基に分子系統樹を作成（右図）
- BP616およびBP625は日本よりも中国の臨床分離株と遺伝的に近縁であった

表. 解析に使用した菌株数

| Isolation Year | Japan | | China | | Total |
|----------------|---------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|------------|
| | Macrolide resistant | Macrolide susceptible | Macrolide resistant | Macrolide susceptible | |
| 2013 | 0 | 3 | 4 | 1 | 8 |
| 2014 | 0 | 4 | 10 | 3 | 17 |
| 2015 | 0 | 10 | 10 | 10 | 30 |
| 2016 | 0 | 10 | 10 | 10 | 30 |
| 2017 | 0 | 2 | 7 | 0 | 9 |
| 2018 | 2 | 4 | 10 | 4 | 20 |
| Total | 2 | 33 | 51 | 28 | 114 |

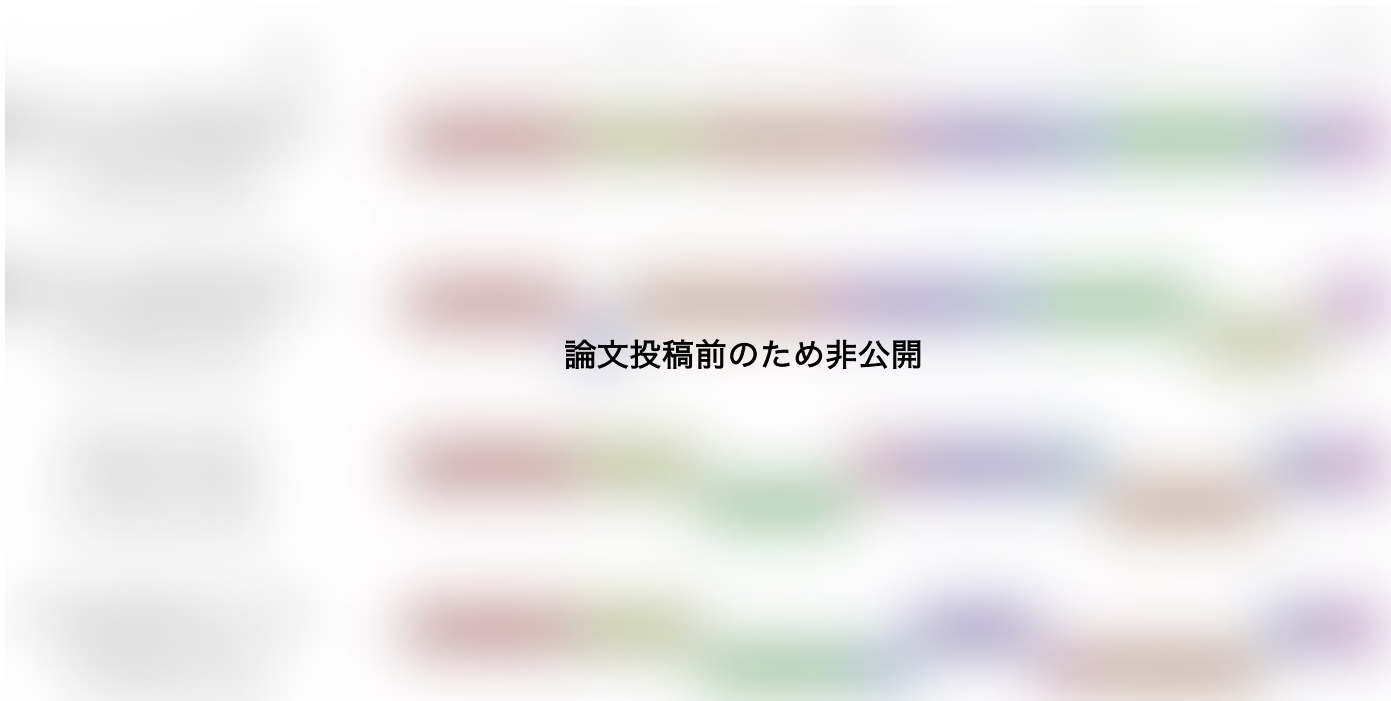
論文投稿前のため非公開



マクロライド耐性百日咳菌の全ゲノム解析 その2

完全長ゲノムの比較

- 4株のMRBP (BP616、BP625、中国およびUSAの百日咳菌) のゲノム全長を比較
- 全ての菌株でゲノム構造が異なった (下図)
- また、BP616とBP625を比較すると、全ての遺伝子を共通して持っていたが、9つの遺伝子上に一塩基変異が確認された



ゲノム構造の比較結果：Homologous regions (相同性の高い領域)は同じ色で示されている
中心線より下のブロックは逆向きの配列を示す

日本におけるマクロライド耐性百日咳菌の現状 (まとめ)

- 2018年に日本国内でマクロライド耐性百日咳菌が2株見つかった。
- 全ゲノム解析の結果から、2つの耐性菌はどちらも中国由来ではあるが、異なる菌株であることが明らかになった。(→ 同一感染源は否定された。)
- このことは、中国から侵入したマクロライド耐性百日咳菌が日本国内で広がっている可能性を示唆している。



百日咳担当室からのお願い

マクロライド耐性百日咳菌検査体制の強化・拡充

- 百日咳菌の収集およびマクロライド耐性菌遺伝子検出キットによるA2047G変異調査のご協力をお願いいたします。
- マクロライド耐性菌遺伝子検出キットをレファレンスセンター以外の地研にも配布します。
- 新規分離株だけでなく、過去(2010年以降)に分離・保存されている菌株も検査対象です。
- 検体（ボイル法によって抽出した細菌DNAや菌株等）をご送付いただければ、感染研で検査致します。



マクロライド耐性百日咳に関する問い合わせは下記までお願いいたします。

国立感染症研究所 細菌第二部・第一室

小出 健太郎 (kkoide@niid.go.jp)

百日咳・ボツリヌスレファレンスセンター会議

2022.7.20

ボツリヌス症レファレンスセンター

**北海道立衛生研究所
千葉県衛生研究所
三重県保健環境研究所
愛媛県立衛生環境研究所
沖縄県衛生環境研究所**

**福島県衛生研究所
神奈川県衛生研究所
岡山県環境保健センター
福岡県保健環境研究所
国立医薬品食品衛生研究所**

**東京都健康安全研究センター
大阪健康安全基盤研究所
山口県環境保健センター
熊本県保健環境科学研究所
国立感染症研究所**

ボツリヌス症：**ボツリヌス神経毒素**によって起こる全身の神経麻痺を生じる神経中毒疾患である。

原因菌：*Clostridium botulinum* (A-F型毒素)
Clostridium argentinense (G型毒素)
Clostridium butyricum (E型類似毒素)
Clostridium baratii (F型類似毒素)

症状：**ボツリヌス神経毒素**はコリン作動性神経末端からの**アセチルコリン**の放出を抑制し、その結果、神経から筋肉への伝達が障害され、麻痺に至る。典型的な臨床症状は、**眼瞼下垂、複視、嚥下障害、構音障害、口内乾燥**等がある。意識は鮮明であり、感覚障害はなく、**通常発熱はない**。嘔吐、腹痛、下痢等があってもすぐに**便秘**になる。

病型：
1) **食餌性ボツリヌス症**
2) **乳児ボツリヌス症**
3) **創傷ボツリヌス症**
4) **成人腸管定着ボツリヌス症**
5) その他（医療行為による感染、実験室内感染、バイオテロによる感染）

治療：**乾燥ボツリヌスウマ抗毒素**の投与。ただし、乳児ボツリヌス症の場合は対症療法を行い、乾燥ボツリヌスウマ抗毒素は使用しない。

ヒトでボツリヌス症を引き起こすボツリヌス神経毒素は、主に**A型、B型、E型**、まれに**F型**である。

食餌性ボツリヌス症（ボツリヌス食中毒）

ボツリヌス食中毒は、食品内に混入したボツリヌス菌芽胞が、嫌気状態の食品内で発芽、増殖し、産生された**ボツリヌス毒素を食品とともに摂取**することにより発症する。ボツリヌス菌芽胞は、土壌、湖沼などに広く分布し、果物、野菜、肉、魚が汚染され得る。

原因食品：**真空パック詰め食品、缶詰、瓶詰め、発酵食品**

| 発生年 | 発生場所 | 患者数 | 原因食品 | 毒素型 |
|------|-------|-----|----------------|-----|
| 1984 | 14都府県 | 36 | カラシレンコン（真空パック） | A |
| 1984 | 青森県 | 1 | 鯛のいずし | E |
| 1984 | 足利市 | 1 | 不明 | B |
| 1984 | 釧路市 | 6 | ハタハタ・鮭のいずし | E |
| 1985 | 函館市 | 1 | 鯛のいずし | E |
| 1988 | 備前市 | 1 | 不明 | A |
| 1988 | 札幌市 | 3 | 自家製鮭の調味乾燥品 | E |
| 1989 | 釧路市 | 1 | ニシンのいずし | E |
| 1989 | 滋賀県 | 3 | ハスずし | E |
| 1989 | 名寄市 | 2 | カレイのいずし | E |
| 1991 | 青森県 | 1 | ウグイのいずし | E |
| 1991 | 広島市 | 1 | 不明 | A |
| 1991 | 青森県 | 1 | アユのいずし | E |
| 1993 | 秋田県 | 4 | 里芋（缶詰） | A |
| 1993 | 高槻市 | 1 | 不明 | 不明 |
| 1995 | 青森県 | 1 | コハダのいずし | E |

| 発生年 | 発生場所 | 患者数 | 原因食品 | 毒素型 |
|------|------|-----|-----------------|-----|
| 1995 | 青森県 | 3 | ウグイのいずし | E |
| 1995 | 北海道 | 6 | 鮭のいずし | E |
| 1996 | 茂原市 | 1 | 不明 | A |
| 1997 | 福島県 | 3 | ハヤのいずし | E |
| 1997 | 福島県 | 1 | イワナのいずし | E |
| 1998 | 東京都 | 18 | グリーンオリーブ（瓶詰） | B |
| 1999 | 大阪市 | 1 | 不明 | A |
| 1999 | 柏市 | 1 | ハヤシライス（真空パック） | A |
| 1999 | 東京都 | 1 | 不明 | A |
| 2007 | 岩手県 | 1 | アユのいずし | E |
| 2012 | 鳥取県 | 2 | あずきばっとう（真空パック） | A |
| 2016 | 奈良市 | 1 | 不明 | A |
| 2017 | 福山市 | 1 | 不明 | B |
| 2019 | 埼玉県 | 1 | 不明 | A |
| 2021 | 東京都 | 1 | 不明（真空パック食品） | F* |
| 2021 | 熊本県 | 3 | 不明（白米もしくは市販の惣菜） | C |

*F型毒素産生性 *Clostridium baratii* による感染

乳児ボツリヌス症

乳児ボツリヌス症は、生後1年未満の乳児がボツリヌス菌芽胞を経口的に摂取した場合、乳児の消化管内で増殖した菌により産生されたボツリヌス神経毒素の作用により発症する。典型的な症状に加え、不活発、哺乳力低下、泣き声の減弱等の症状が認められる。

原因：蜂蜜の摂取、環境中のボツリヌス菌の摂取

| 発生年 | 患者数 | 蜂蜜摂取歴 | | | 毒素型 | | | |
|------|-----|-------|----|----|-----|---|----|----|
| | | あり | なし | 不明 | A | B | E | 不明 |
| 1986 | 1 | 1 | | | 1 | | | |
| 1987 | 9 | 9 | | | 6 | | | 3 |
| 1989 | 2 | 2 | | | 2 | | | |
| 1990 | 1 | | | 1 | | | | 1 |
| 1992 | 1 | | | 1 | 1 | | | |
| 1995 | 1 | | 1 | | | 1 | | |
| 1996 | 1 | | 1 | | 1 | | | |
| 1999 | 1 | | 1 | | 1 | | | |
| 2004 | 1 | | 1 | | | | 1* | |
| 2005 | 2 | | 2 | | 1 | 1 | | |
| 2006 | 2 | | 2 | | 1 | 1 | | |
| 2007 | 2 | | 2 | | | | | |
| 2008 | 1 | | 1 | | 1 | | | |
| 2010 | 1 | | 1 | | 1 | | | |
| 2011 | 5 | | 5 | | 3 | 2 | | |
| 2015 | 1 | | 1 | | | | | 1* |
| 2016 | 3 | | 2 | 1 | 1 | 2 | | |
| 2017 | 3 | 1 | 2 | | 3 | | | |
| 2018 | 1 | | 1 | | | 1 | | |
| 2019 | 1 | | 1 | | | 1 | | |
| 2020 | 2 | | 2 | | | 2 | | |
| 2021 | 1 | | 1 | | 1 | | | |

* 2例ともE型毒素産生性 *Clostridium butyricum*による感染

乳児ボツリヌス症

乳児ボツリヌス症は、生後1年未満の乳児がボツリヌス菌芽胞を経口的に摂取した場合、乳児の消化管内で増殖した菌により産生されたボツリヌス神経毒素の作用により発症する。典型的な症状に加え、不活発、哺乳力低下、泣き声の減弱等の症状が認められる。

原因：母乳の摂取、環境中のボツリヌス菌の摂取

成人腸管定着ボツリヌス症

成人や1歳以上の小児において、乳児ボツリヌス症と同様の病態で、ボツリヌス毒素産生菌が消化管内で増殖し産生されたボツリヌス神経毒素の作用により発症する。消化管に器質的あるいは機能的異常がある場合や、抗生薬使用等による消化管で腸内細菌叢の攪乱が認められる場合が多い。

日本では、2016年から2020年までに計3例の成人腸管定着ボツリヌス症の届出があり、2例は、各々5歳および4歳の基礎疾患を持つ小児で、残る1例は臓器移植歴のある成人であった。3例ともA型ボツリヌス菌による感染であった。

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|---|---|---|---|---|----|--|------|---|---|---|--|---|--|--|
| 1996 | 1 | 1 | 1 | | | | | 2017 | 3 | 1 | 2 | | 3 | | |
| 1999 | 1 | 1 | 1 | | | | | 2018 | 1 | | 1 | | 1 | | |
| 2004 | 1 | 1 | | | | 1* | | 2019 | 1 | | 1 | | 1 | | |
| 2005 | 2 | 2 | | 1 | 1 | | | 2020 | 2 | | 2 | | 2 | | |
| 2006 | 2 | 2 | | 1 | 1 | | | 2021 | 1 | | 1 | | 1 | | |

* 2例ともE型毒素産生性 *Clostridium butyricum* による感染

ボツリヌスといえば**蜂蜜**ではない！

- 食餌性ボツリヌス症の原因に蜂蜜は含まれない。蜂蜜は乳児ボツリヌス症の明らかな原因食品であるが、蜂蜜を食べていない症例の方が多数のため、**蜂蜜を食べていない=ボツリヌス症ではない**、とはならない。また、蜂蜜からボツリヌス菌が分離されても、その蜂蜜を市場から回収する必要はない。

患者が**1歳以上**の場合、まず**食中毒**を疑う！

- 第二、第三の症例を出さないため、食歴調査を行い、原因食品を突き止める必要がある。患者が食べた**食品の残りを廃棄せず、保管することが大事！**

乳児ボツリヌス症の患児は**回復後の排泄ケア**に注意！

- 乳児ボツリヌス症では、乳児の腸内でボツリヌス菌が増殖するため、乳児が回復したあとも、数週間から数ヶ月間、便とともにボツリヌス菌が排泄される。そのため、保育園など他に1歳未満の乳児がいる場では、**オムツ交換時に周囲の環境を便で汚さない**ようにする。ボツリヌス菌は、芽胞を作るため、アルコールなどの消毒薬が無効のため、石けんと流水での手洗いが必須。

「細菌学的検査」

検体： **血清（抗毒素投与前）**
糞便（便秘のため取り難いが、わずかでもいいのでなんとか取ってもらう）

試験：

＜マウス試験法＞

- ①処理した検体（血清、糞便）について、診断用抗毒素と混合したサンプル（中和サンプル）と混合していないサンプル（非中和サンプル）を調製し、マウス腹腔へ接種し、症状を観察する。
- ②糞便を培地に播種し、30℃（もしくは37℃）で5日間静置培養した培養上清について中和サンプルと非中和サンプルを調製し、マウス腹腔へ接種し、症状を観察する。



＜リパーゼ産性能の確認＞

糞便を培養した培地をブルセラHK卵黄寒天培地に播種し、嫌気的条件下で30℃（もしくは37℃）、48時間培養し、リパーゼ産性能を確認する。

＜毒素遺伝子の検出＞

ブルセラHK卵黄寒天培地上のコロニーのDNAを抽出し、毒素遺伝子の有無をPCRにて確認する。



ボツリヌス症の細菌学的検査に関する講習会

- 稀少感染症であること、動物実験を必要とすることから、検査の技術継承が難しい
- 毎年「動物実験」を中心に講習会を開催。
- 2018年度より、参加者によるマウス接種実施開始。
- 参加をご希望の場合は、細菌第二部第三室 妹尾(senoh@niid.go.jp)、油谷(yutanim@niid.go.jp) まで

第9回講習会

2022年11月開催予定

参加者募集中（実験室の都合上4名まで）

ボツリヌス症の細菌学的検査に必要な試薬の配布

- **A、B、E、F型の診断用抗毒素**は、ご要望に応じて配布していますので、ご連絡ください。
- **C、D、G型の診断用抗毒素**は国立感染症研究所に保存してあります。**C、D、G型毒素産生性ボツリヌス症を疑う**場合はご連絡ください。
- ボツリヌス毒素遺伝子検出用PCRのための、**陽性コントロール**が必要な場合はご連絡ください。

問い合わせ先は、**細菌第二部第三室 妹尾(senoh@niid.go.jp)**
油谷(yutanim@niid.go.jp)です。